

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Off nl gungsschrift  
10 DE 196 11 759 A 1

51 Int. Cl. 6:  
C 12 N 9/12  
C 12 N 15/54  
C 12 N 15/79  
C 12 N 15/74  
C 12 P 19/34

21 Aktenzeichen: 196 11 759.3  
22 Anmeldetag: 25. 3. 96  
43 Offenlegungstag: 2. 10. 97

DE 196 11 759 A 1

71 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

72 Erfinder:  
Frey, Bruno, Dipl.-Biol. Dr., 82377 Penzberg, DE;  
Niehaus, Frank, Dipl.-Biol., 23558 Lübeck, DE;  
Antranikian, Garabed, Dr., 21218 Seevetal, DE

54 Thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermococcus spec.*

57 Thermostabiles Enzym mit DNA-Polymerase- und 3'-5'-Exonuklease-Aktivität erhältlich aus *Thermococcus spec. TY* (DSM 10597); die zugrunde liegende genomische DNA entspricht den in SEQ.ID NO:2 und SEQ.ID NO:3 wiedergegebenen Nukleinsäuresequenzen. Die Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur Herstellung des rekombinanten thermophilen Enzyms sowie dessen Verwendung zur spezifischen Vervielfältigung von Nukleinsäuresequenzen.

DE 196 11 759 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine thermostabile DNA-Polymerase aus Archaeobakterien, ein Verfahren zu deren Gewinnung bzw. Klonierung sowie deren Verwendung, insbesondere zur enzymatischen Amplifikation von spezifischen Nukleinsäuresequenzen (z. B. PCR). Insbesondere können mit dem erfindungsgemäßen Enzym, welches aus einem *Thermococcus*-Stamm erhältlich ist, Nukleinsäurefragmente bis zu einer Länge von ca. 5,0 kb spezifisch und in guter Ausbeute amplifiziert werden.

Es sind heute eine Reihe thermostabiler DNA-Polymerasen aus Archaeobakterien bekannt (Canganella F. und Jones W., *Current Microb.* 28, 199–306 (1994)). Die Enzyme kommen hauptsächlich zur spezifischen Vervielfältigung bestimmter Nukleinsäuren in der klinischen Diagnostik und im Forschungsbereich zum Einsatz. Viele dieser thermostablen DNA-Polymerasen weisen jedoch nicht gewünschte (Neben-)aktivitäten auf bzw. bewirken bei entsprechenden Amplifikationsverfahren keine ausreichende Spezifität der Nukleinsäurefragmente oder sind lediglich über schwer zugängliche Mikroorganismen zugänglich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit, eine neue thermostabile DNA-Polymerase zur Verfügung zu stellen, die sich insbesondere gut zur spezifischen Vervielfältigung von Nukleinsäurefragmenten von ca. 10 kb Länge oder kürzeren Fragmenten eignen und sich in guter Ausbeute reproduzierbar zur Verfügung stellen lassen.

Die Aufgabe wird gelöst durch einen hoch thermophilen Mikroorganismus, welcher ein Enzym mit DNA-Polymerase-Aktivität aufweist bzw. eine für das Enzym codierende Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ. ID NO: 2 oder hiervon abgeleitete Fragmente enthält. Das thermophile Enzym mit DNA-Polymerase-Aktivität besitzt eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten bei ca. 90° C (relativ zur Ausgangsaktivität). Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt zwischen ca. 65° und 90° C, vorzugsweise bei ca. 70° C bis 80° C. Ferner weist die erfindungsgemäße DNA-Polymerase ein pH-Optimum zwischen ca. 7,2 und 7,8, insbesondere bei ca. pH 7,5 auf und zeigt eine optimale Aktivität bei einer Kaliumchloridkonzentration zwischen 60 und 120 mM, bevorzugt bei ca. 80 bis 100 mM. Die Anwesenheit von Magnesiumionen ist für die Aktivität des Enzyms unerlässlich, und zwar vorteilhafterweise in Konzentrationen von ca. 10 mM oder weniger. Insbesondere hat sich eine Konzentration von ca. 4 mM Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) als geeignet erwiesen und wenn zudem keine bzw. lediglich Spuren von Manganionen, wie z. B.  $MnCl_2$ , zugegen sind. Es konnte vielmehr gezeigt werden, daß die Anwesenheit von Manganionen, ab ca. 2 mM, die Polymeraseaktivität deutlich inhibiert.

Die erfindungsgemäße DNA-Polymerase weist zudem 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, d. h. sogenannte "proofreading"-Aktivität auf. Bei der PCR-Reaktion findet aufgrund dieser Aktivität eine Degradation der jeweiligen Primer bei einer bestimmten Konzentration an Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) statt; bei höheren Nukleotidkonzentrationen zeigte sich bei Verwendung des erfindungsgemäßen Enzyms nur noch eine geringe 3'-5'-Exonukleaseaktivität bzw. wird diese von der Polymeraseaktivität des Enzyms überlagert. Ribonukleotide werden von dem erfindungsgemäßen Enzym nicht eingebaut.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung der DNA-Polymerase aus entsprechenden thermophilen Mikroorganismen, wie einem heterotrophen, schwefelreduzierenden Isolat eines Archaeon mit einem Temperaturoptimum bei ca. 88° C. Insbesondere hat sich hier der Mikroorganismus *Thermococcus spec. TY* als geeignet erwiesen. Eine Probe des Stammes ist am 20.03.1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38 124 Braunschweig unter Nr. 10 597 hinterlegt worden.

Nach geeigneter Fermentation wurde die gesamte chromosomale DNA durch mehrmalige Phenolextraktion isoliert. Die Detektion von DNA-Polymerasen kodierenden Nukleinsäuresequenzen aus *Thermococcus spec. TY* erfolgte mittels PCR-Screening, die Identifizierung homologer DNA-Fragmente mittels Southern Blot. Dabei ergaben sich zwei Restriktionsfragmente, die zur Klonierung eingesetzt wurden. Nach entsprechender Selektion über Erstellung einer angereicherten Genbank, Plasmidligation, Transformation und Screening mittels PCR wurde die Sequenz der DNA ermittelt (SEQ. ID NO: 2). Der Vergleich der entsprechenden Aminosäuresequenz mit der anderer archaeobakteriellen DNA-Polymerasen ergab eine hohe Homologie der Enzyme. Jedoch ist das TY-Gen das einzige Gen, in dem alle drei konservierten Inteinregionen enthalten sind. Dadurch ist eine klare Differenzierung zwischen Intein- und Exteinbereichen möglich, was insbesondere vorteilhaft für das angestrebte Expressionsprodukt ist. Die inteinfreie DNA-Sequenz (SEQ. ID NO: 3) wurde zur Expression verwendet. Entsprechend geeignete Stämme sowie diesbezügliche Methoden, beispielsweise zum Aufschließen der Zellen nach Expression und Proteinreinigung sind dem Fachmann prinzipiell geläufig. Für die Aufreinigung des TY-DNA-Polymeraseproteins hat sich besonders vorteilhaft erwiesen, wenn der mittels Zellaufschluß gewonnene Rohextrakt zunächst einer Hitzedenaturierung und anschließend mindestens zwei Affinitätschromatographien, eine zur Abtrennung von Nukleotid-bindenden, Proteinen (z. B. Blue Sepharose) und eine für Histidylgruppen-aufweisende Bestandteile (z. B. Nickelchelat), unterzogen wird. Auf diese Weise konnten annähernd 50% der Ausgangsaktivität der TY-DNA-Polymerase mit einer spezifischen Aktivität von ca. 4500 U/mg erzielt werden, was einer Anreicherung um den Faktor von ca. 134 entspricht.

Die aufgereinigte Fraktion zeigte neben DNA-Polymerase-Aktivität zudem 3'-5'-Exonuklease-("proofreading")-Aktivität. Dabei zeigte sich, daß eine Degradation des verwendeten Primers bis zu einer Nukleotidkonzentration von ca. 1  $\mu M$  an Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) im Reaktionsansatz stattfindet. Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität wird dagegen bei höheren Nukleotidkonzentrationen von der Polymeraseaktivität des Enzyms überlagert. Die in einem weiteren Testansatz zugegebenen Ribonukleotide (NTPs, 100  $\mu M$ ) konnten nicht eingebaut werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist der Einsatz der TY-DNA-Polymerase zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente, wie beispielsweise in der PCR. Hierfür haben sich prinzipiell die dem Fachmann für die PCR bekannten Pufferlösungen als geeignet erwiesen. In der Regel wird ein 2 bis 50 mM, bevorzugt ca. 5 bis 20

mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,9) verwendet, der 10 bis 100 mM, bevorzugt ca. 20 bis 60 mM Kaliumchlorid, 0,75 bis 4 mM, bevorzugt 1,00 bis 2,00 mM Magnesiumchlorid und ein zwitterionisches Detergenz in einer Menge von ca. 0,01 bis 0,1% aufweist. Das Detergenz Tween 20 hat sich hier als besonders vorteilhaft erwiesen.

Auf diese Weise konnten Nukleinsäurefragmente bis zu einer Länge von ca. 5000 Basenpaaren spezifisch amplifiziert werden. D.h. die erfindungsgemäße DNA-Polymerase hat gegenüber anderen "proofreading", Polymerasen insbesondere den Vorteil, daß sie als einzelnes Enzym bereits 4 bis 5 kb lange Fragmente aus genomischer DNA in guter Ausbeute spezifisch amplifizieren kann.

## Abbildungen

### Abb. 1

a: Temperaturabhängigkeit TY-DNA-Polymerase.  
b: Mg/Mn-Abhängigkeit TY-DNA-Polymerase.

### Abb. 2

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung der TY-DNA-Polymerase. Als Primer wurden verwendet: 1. [extein 1-extein 2], 2. [extein 1-extein 4], 3. [extein 1-extein 6] (s. Tabelle 1). Als Template wurde chromosomale DNA aus *Thermococcus spec. TY* (DSM 10597) eingesetzt.

### Abb. 3

Southern Blot der chromosomalen DNA aus *Thermococcus spec. TY*, restringiert mit 1. XbaI, 2. PstI, 3. KpnI, 4. SphI und 5. SacI. Als Sonde wurde das Dig-PCR-Fragment [tcg1-c1190] verwendet.

### Abb. 4

Sequenzierungsverfahren pTY1 und pTY2. Ausgangsvektor ist pUCBM21 (Boehringer Mannheim). In beiden Fällen ist das Insert, bezogen auf die Richtung des Primers tcg1, im Uhrzeigersinn insertiert. Im Fall von pTY1 beträgt die Fragmentgröße zwischen tcg1 und pUC/M13 forward ca. 1,3 kb, im Fall pTY2 ca. 3,2 kb.

### Abb. 5

Sequenzierungsvektor pTY3. Ausgangsvektor ist pCR<sup>TM</sup>II (Invitrogen). Das über eine PCR mit den Primern [c2981-680peprev] amplifizierte Insert hat eine Größe von ca. 2,7 kb.

### Abb. 6

Southern Blot der chromosomalen DNA aus *Thermococcus TY*, restringiert mit 1. ApaI, 2. SacI, 3. SmaI, 4. BamHI, 5. HindIII, 6. KpnI und 7. SphI. Als Sonde wurde das Dig-markierte PCR-Fragment mit dem Primerpaar [cty351-cty770] verwendet.

### Abb. 7

Sequenzierungsvektor pTY4. Ausgangsvektor ist pCR<sup>TM</sup>II (Invitrogen). Das über eine PCR mit den Primern [cty351-pUC/M13 rev] amplifizierte Insert hat eine Größe von ca. 1,2 kb.

### Abb. 8

Graphische Übersicht über die Anordnung der Extein- und Inteinregionen der TY DNA-Polymerase im Vergleich zu bekannten DNA-Polymerasen.

### Abb. 9

Prinzip der Deletion mittels PCR.

### Abb. 10

Expressionsvektor pTYPol.

### Abb. 11

SDS-PAGE (Gradient 10–15%) der Aufreinigung der TY-DNA-Polymerase (Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine des TY-Rohextraktes (Spur 1), nach Hitzedenaturierung, 10 min, 80°C (Spur 2) und der beiden chromatographischen Aufreinigungen (Hi Trap Blue, Spur 3; Ni-Chelat, Spur 4); LS Längenstandard).

Abb. 12

Verwendung der TY-DNA-Polymerase in der PCR und Auftrennung im SDS-PAGE:

- a) Spur 1 : 1,3 kb; Spur 2 : 2,6 kb; Spur 3 : 4,35 kb; MWM: Molekulargewichtsmarker  
 b) Abhängigkeit der Menge an PCR-Produkt vom pH-Wert.  
 c) und von der Konzentration an  $MgCl_2$  (0,5–3,0 mM).

SEQ. ID NO: 1

```

1   CCACUGCUAU GGGGGUCCGA CUAAGCCAUG CGAGUCAUGG GGUCCCUUCG GGACACCACC
15  61   GGCGGACGGC UCAGUACAC GUCGGUAACC UACCCUCGGG AGGGGGADAA CCCCGGGAAA
    121  CUGGGGCUAA UCCCCAUAG GCCUGAGGUA CUGGAAGGUC CUCAGCCCGA AAGGGGCUUU
    181  UGCCCGCCCG AGGAUGGGCC GCGGCCGGAU UAGGUAGUUG GUGGGGUAA C GGCCACCAA
    241  GCCGAAGAUC GGUACGGGCU GUGAGAGCAG GAGCCCGGAG AUGGACACUG AGACACGGGU
20  301  CCAGGCCCUA CGGGGCGCAG CAGGCGCGAA ACCUCCGCAA UGCGGGAAAC CGCGACGGGG
    361  GGACCCCGAG UGCCGUGGUA UCGACACGGU UUUUCCGGAG UGUAAAAAGC UCCGGGAADA
    421  AGGGCUGGNC AAGGCCGGUG GCAGCCGCCG CGGUAAUACC GCGGCCCGA GUGGUGGCCG
25  481  CUAUUAUUGG GCCUAAAGCG UCCGUAGCCG GGCCCGUAAG UCCUUGGCGA AAUCCACGG
    541  CUCAACCGUG GGGCUUGCUG GGGADACUGC GGGCCUUGGG ACCGGGAGAG GCCGGGGGUA
    601  CCCUUGGGGU AGGGGUGAAA UCCUUAUADC CCAGGGGGAC CGCCAGUGGC GAAGGCGCCC
30  661  GGCUGGAACG GGUCCGACGG UGAGGGACGA AGGCCAGGGG AGCAAACCGG AUUAGAUACC
    721  CGGGUAGUCC UGGAUGUAAA GGAUGCGGGC UAGGUGUCGG GCGAGCUUCG AGCUCGCCCC
    781  GUGCCGUAGG GAAGCCGUUA AGCCCGCCGC CUGGGGAGUA CGGCCGCAAG GCUGAAACUU
35  841  AAAGGAADUG NCGGGGGAGC ACUACAAGGG GUGGAGCGUG CGGUUUAUUG GGAUUCACG
    901  CCGGGAACCU CACCGGGGGC GACGCGAGGA UGAAGGCCAG GCUGAAGGUC UUGCCGGACA
    961  CGCCGAGAGG AGGUGCAUGG CCGCCGUCAG CUCGUACCGU GAGGCGUCCA CUUAGUGUG
40  1021  GUAACGAGCG AGACCCGCGC CCCAGAUUGC CAGCCCUUCC CGUUGGGAAG GGGGCACUCU
    1081  GGGGGGACUG CCGGCGAUAA GCCGGAGGAA GGAGCGGGCG ACGGUAGGUC AGUAUGCCCC
45  1141  GAAACCCCGG GGUACACGC GCGCUACAU GGGCGGGACA AUGGGAUCCG ACCCCGAAAG
    1201  GGAAGGUAA UCCCUAAAC CCGCCUUCAG UUCGGAUCGC GGGCUGCAAC UCGCCCGCGU
    1261  GAAGCUGGAA UCCUAGUAC CCGCGUGUCA UCAUCGCGCG G

```

SEQ. ID NO: 1 16S rDNA Sequenz aus *Thermococcus spec. TY*

SEQ. ID NO:2

TYPol Intron

90  
ATGATATTAGACACTGACTACATAACAAAGGAAGGTAAACCCATAATTGGAATTTTCAAGAAAGAGAACGGGAATTTAAATAGAACTT  
M I L D T D Y I T K D G K P I I R I F K K E N G E F K I E L 5

180  
GATOCACATTTTCAGCCCTACATTAGGCTCTCTCAAGATGACTCGGCTATTGATGAATAAAAGCAATAAAGGGGAGAGACACGGA  
D P H F Q P Y I Y A L L K D D S A I D E I K A I K G E R H G 10

270  
AAAATTGTGAGTAGTGTGATGCACTGAAAGTCAAGAAGAAATTTTGGGGAGAGATGTTGAGGTCTGGAGCTTATATTGAGCATGCC  
K I V R V V D A V K V K K K F L G R D V E V W K L I F E H P 15

360  
CAAGAGCTCCCGGCTTAAGGGGCAAGATAGGGAACATCCAGCTGTGATTGACATTTATGAGTACGACATACCCCTTTGCCAAGGGCTAC  
Q D V P A L R G K I R E H P A V I D I Y E Y D I P F A K R Y

450  
CTCATAGACAAGGGCTTGATCCCTATGGAGGGGCAAGAGGAGCTTAAGCTTAATGGCTTGGACATTGAGAGGTTTACCAAGAGGAGAC  
L I D K G L I P M E G D E E L K L M A F D I E T F Y H E G D 20

540  
GAGTTTGGGAAGGGGAGATATATGATAGCTAGCCGATGAGGAGAGGCAAGGTAATTACATGGAAGAAATATGATCTGCCCTAC  
E F G K G E I I M I S Y A D E E E A R V I T W K H I D L P Y 25

630  
GTTGATGTTGATCCAAAGGAGATGATAAGCGGTTTGTGCAAAATGTGAGGGAAGAACCCCGATGTCTGATAACTTACAT  
V D V V S N E R E M I K R F V Q I V R E K D P D V L I T Y N 30

720  
GGAGACAACCTTTGATTTGCCGTACCTTTAAAGGGGAGAGAGTGAAGGTTACTCTCTCTGGGGAGGGACAAGAACACCCCGAG  
G D N F D L P Y L I K R A E K L G V T L L L G R D K E H P E

810  
CCCAAGATTCAAGAGTGGGGATAGCTTTGCCGTGAAATTAAGGCCAGATTCACTTTGATCTCTTCCCGGTGTGGGGAGAACCATTA  
P K I H R M G D S F A V E I K G R I H F D L F P V V R R T I 35

900  
AACTCCCAACATACAGCTTGAGGCGATTATGAAGCGGCTCTGGGAAAGCAAGCTGGGTGGGAGGAAATGCCGCCATC  
N L P T Y T L E A V Y E A V L G K T K S K L G A E E I A A I 40

990  
TGGGAACAGAGGAGAGCATGAAGAGCTGGGCCAGTACTGATGAGAGATGCTAGGGCAACTTATGAACCTGGAAAGAGTTTTCGCC  
W E T E E S H K K L A Q Y S M E D A R A T Y E L G K E F F P

1080  
ATGGAGGCAAGCTAGCAAGCTAATAGGCCAAGGCTATGGAGGCTCTCAAGATCAAGCACTGGCAACTTGTAGAGTGGTACTGTGA  
M E A E L A K L I G Q S V W D V S R S S T G N L V E W Y L L 45

1170  
AGGGTGGCATATGAGAGGATGAGCTGCTGCTGCAAGCGGATGAAGAGAGTACAGAGGGGTTTAAAGGACTACTTACCTGGGAGGA  
R V A Y E R N E L A P N K P D E E E Y R R R L R T T Y L G G 50

1260  
TACGTAAAGAGCGCGAAGAGGCTTATGGGAGAACATGCGCTATTAGACTTTAGGTGCCACCTGCGAGATACAAAGTCATAGTAAA  
.Y V K E P E R G L W E N I A Y L D F R C H P A D T K V I V K 55

1350  
GGCAAGGAATGTGATATTAGCGATGTTAAGAGGAGACTACATAGGAATAGTGGGTGGCAAGAGTCAAAAAGTCTGGGAG  
G K G I V N I S D V K E G D Y I L G I D G W Q R V R K V W K

1440  
TATCATTACGAGGCAAACTATCAATATAACGGCTTAAAGTCACTCCAAATCATAAGGTCCCGGTAGTACCGGAAATGATCGGCAA  
Y H Y E G K L I N I N G L K C T P N H K V P V V T E N D R Q 60

1530  
 ACTAGGATTAGAGATAGTCTCTGCAAAATCATTCCTCTCAGGAAAGTAAAGGTAAATATACACAACAAAGCTTTTGA AAAAATGCC  
 T R I R D S L A K S F L S G K V K G K I I T T K L F E K I A

5 1620  
 GAGTTTGAGAAAAACAGCCTTCTGAGAGGAAATATTAAAGGGGAACTTTTCAGGGATTATTTAGCGGAGGGACATGCTTCGAAAA  
 E F E K N K P S E E E I L K G E L S G I I L A E G T L L R K

10 1710  
 GATATTGATACCTTCGATTCTATCGAGGTA AAAAGAGATCTCACAACATATAGAGTGAATAACAAATGGGAAACGAAAGGAG  
 D I S Y F D S S R G K K R I S H Q Y R V E I T I G E N E K E

15 1800  
 CTTTTCAGAGGATTCTATACATTTTCGATAAGCTGTTTGGCATAAGACCTCTCTGTA AAAAGAGGGAGACACAATGGCTTAAATTT  
 L L E R I L Y I F D K L F G I R P S V K K K G D T N A L K I

1890  
 ACTACCGCAAGAAAGGGTTTACTTCAATCGAGGAACTTTTGA AAAACATTGAAAGCTTTTACGGCCAGCAGTATGAGGGGCTTT  
 T T A K K A V Y L Q I E E L L K N I E S L Y A P A V L R G F

20 1980  
 TTTGAAGAGATGGCACTGTGAACAAATAGGAGTACATAGTTGTACTCAAGGTACAAACAAATGGAAATAGATATAGTACGA  
 F E R D A T V N K I R S T I V V T Q G T N N K W K I D I V A

25 2070  
 AAGTTACTTGCAGCCTTGGATGCCATATAGCGGCTATGAGTACAAATACATTGAAATGGAAAGGAGTTGACTAGCATATTTTAGAA  
 K L L D S L G I P Y S R Y E Y K Y I E N G K E L T K H I L E

2160  
 ATACAGCAAGGGATGGACTTATTTTATTCAAACACTGGTGGGGTTCATAGTTTCAGAGAAAAGAGCTTTAGAGAAAGCAATTGAA  
 I T G R D G L I L F Q T L V G F I S S E K N E A L E K A I E

30 2250  
 GTTAGAGAAATCAATAGACTTAAGATAACGCTTCTACAACTTTCAACGTTTGAAGTGCTCTCGAATATTATAAGGGGAGGTTTAT  
 V R E M N R L K N N S F Y N L S T F E V S S E Y Y K G E V Y

35 2340  
 GACCTAACCTTAGAAGGAAACCCCTATTATTTTGC AAATGGAAATCTGACTCACAATTCCTATACCCCTCAATATAGTTTACCCACAC  
 D L T L E G N P Y Y F A N G I L T H N S L Y P S I I V T H N

40 2430  
 GTCTCCCTGACACTTTAGAAAGAGAGGCTGCAAGATTAAGATGTGCCCCGATAGTATAGTTTATAGTCTCTGCAAGGATTTTCCCGGT  
 V S P D T L E R E G C K N Y D V A P I V G Y K F C K D F P G

45 2520  
 TTCAATCATCTATACCTGGGGATTAATCAATGAGGCAAGAAATTAAGAGCAACATGAAGCTACAAATGACCCATAGAAAAGAAA  
 F I P S I L G E L I T H R Q E I K K K H K A T I D P I E K K

2610  
 ATGCTTGATTTTAGGCAAGAGGCTGTAAATGTCTGCCAAACAGCATTTTGGCAATGAATGGCTACCAATTAATTGAAACGGGAGAGTA  
 M L D Y R Q R A V K L L A N S I L P N E W L P I I E N G E V

50 2700  
 AAATTCGTAAAAATGGTGAAGTTCATAGACCGCTACATGGAGAGCAAAAGGCAAAAGTAAAGCAAGTGGTAATCTGAAGTTCTCGAA  
 K F V K I G E F I D R Y M E E Q K D K V R T V D N T E V L E

2790  
 GTGGATAACATCTTTGCATTTTCAATAAAGCAAGCAAAAAGAGGAGATCAGAAGTCAAAAGCCCTCATAGGCATAGTACAG  
 V D H I F A F S L N K E S K K S E I K K V K A L I R H K Y K

55 2880  
 GGTGAAGCTTACGAGGTGGCTCACTCTGGAGAAAATCCACATACCCGTTGGTCACAGCTTGTTCAGATTAGGAACGGGAAATA  
 G E A Y E V E L N S G R K I H I T R G H S L P T I R N G K I

2970  
 AAGGAATATGCGGAGAGAAGTAAAGTTGGGACCTTATAATAGTGGCCAAAAAGTTAAGCTCAATGAAAAAGAGCCGCTCATCAAC  
 K E I W G E E V K V G D L I I V P K K V K L N E K E A V I N

3060  
 ATTCCAGAGTTGATTTTGAAGTGGGCGATGAAGACAGGCGGATGTTGTTATGACAACCCAGTTAAGGGAAGAAAGAACTTCTTAA  
 I P E L I S K L P D E D T A D V V M T T P V K G R K N F F K

3150  
 GGCATGCTGAGAACTAAAGTGGATTTTGGAGAGGAAGCAAGAGATTAGGAGCTTTAAGAGGTACCTCTTCCATCTTGAAGAGCTT  
 G M L R T L K W I F G E E S K R I R T F N R Y L F H L E E L

3240  
 GGTTTGTAAATTTGCTGCGGCGTGGATATGAGTCAAGGCTGGGAGGGCTAAAAAGTATAGGCAACTTTAGAGAGAGCTGCTAAAA  
 G F V K L L P R G Y E V T D W E G L K R Y R Q L Y E K L V K

3330  
 AAGCTCAGATACAATGGAATAGAGGGGTATTTAGTGGAGTTTAAAGATATCAAGAGCTCCGTATCTTGGCTTCCAGAGAGAGGAGCTT  
 N L R Y N G N K R E Y L V R F N D I K D S V S C F P R K E L

3420  
 GAAGATGGAAATTTGAGAGTCAAGGGGTTAGGTTAGAGTGCATCTCAAGTGGATGAGGATTTGGAAAGTTCTTAGGCTACTAT  
 E E W K I T K G F R K C I L K V D E D F G K F L G Y Y

3510  
 GTCAGCGAGGCTATGCGGGGGCTCAGAAACAAACAGGTGGATGAGCTACTCAGTAAGCTCTATAATGAGATCTCAAGTCTCTC  
 V S E G Y A G A Q K N K T G G M S Y S V K L Y N E N P N V L

3600  
 AAGATATGAAAAATATTGAGAGAGTTTGGCAAGTTAGAGTGGGCAAAAGCTGTGTGGATATACAAAAAGATGGCTACCTT  
 K D M K N I A E K F F G K V R V G K N C V D I P K K M A Y L

3690  
 CTGCGGAATCTCTGTTGAGTAAACAGAGAGCAAAAGGATCTCTCAATTATATTGATTCTCTGAAGCTGTAGATGGGCAATC  
 L A K S L C G V T A E N K R I P S I I F D S S E P V R W A F

3780  
 TTGAGAGGTTATTTGTTGGTGGATTTCTCTCAAAAGGCTTAGGCTCTCACAAGGAGGCTCTAGCAAAAGGAGCTT  
 L R A Y F V G D G D I H P S K R L R L S T K S E L L A N Q L

3870  
 GTATTTCTTAAACTCTTGGAGTTTCTCTTAAAGTTGGGTTGACAGCGGGGTTTATAGGGTTTACATAAGAGGAGTTTGGG  
 V F L L N S L G V S S I K I G F D S G V Y R V Y I N E D L P

3960  
 TTCTTCAAACTTCGAGGCGAAAAACAGTACTACCTAATCTTATTCOAAGGAGGTTCTTGAAGAAATATGGGAAGAAATTCOA  
 F L Q T S R Q K N T Y Y P H L I P K E V L E E I F G R K F Q

4050  
 AAGACATAAGTTTGAAGAAATCAAGAGCTGGCTGAGTGGGAAAGCTGACAAAAGAAAGTCAAGCTCTTGGATTCTCTCTCAAT  
 K N I T F E K F K E L A D S G K L D K R K V K L L D F L L N

4140  
 GGAGCATTTGCTTGCAGAGTAAAGATGTTGAAAAAGAGATATGAAGGGTATGTTCTATGATTGAGGTTGAAGCAAGCAAAAC  
 G D I V L D R V K N V E K R E Y E G Y V Y D L S V E D N E N

4230  
 TTCTCTGTTGGTTTGGACTGCTCTAGCCACACACAGCTATTAAGGTTATATGGGCTATCCCAAGGCGAGGTTGTTCTGAGGAGATGT  
 F L V G F G L L Y A H N S Y Y G Y M G Y P K A R W Y S K E C

4320  
 GCGAAGAGGTTACCGCGTGGGAGGCACTACTAGAAATGACCTTAAAGAGATAGAGGAGAAATTTGGATTAGGTTGCTATATGCC  
 A E S V T A W G R H Y I E M T I K E I E E K F G F K V L Y A



4410  
 GACAGCGTTACGGGTGATACGGAGATAATCGTTAAGAGAAATGGGCGGATAGAGTTTGTTCCTATTGAAAAGCTCTTTGAAOOGGTAGAT  
 D S V T G D T E I I V K R N G R I E F V P I E K L F E R V D

5  
 4500  
 TACGGGATTGGAGAAAAGAACTACTGCATCCTTGAGGAGTTGAAGCGGCTGACACTGACAAATAGAGGCAAGCTCATCTGGAAGAAAGTT  
 Y R I G E K E Y C I L E D V E A L T L D N R G K L I W K K V

10  
 4590  
 CGGTACGTTATGAGGCACAGGCGAAAAGAGGTCTACCGCATCTGGATTACAACCTGGTGTACATTGAAGTTACCGAGGATCACTCT  
 P Y V M R H R A K K K V Y R I W I T N S W Y I D V T E D H S

15  
 4680  
 CTTATAGTAGCTGAGGTGTCTGAAGGAGCTAGGCCAATGGAAATOGAAGGCAAGAGCTAATAGGCAAGAGATGAACCTTTGAGGA  
 L I V A E D G L K E A R P M E I E G K S L I A T K D D L S G

20  
 4770  
 GTGAATATATCAAGCTCTAGCCATGAGGAAATCTCTACAAGGCTACGTTTACGACATGAGGTTGAGGGGAGCCACAGGTTCTTC  
 V E Y I K P H A I E E I S Y N G Y V Y D I E V E G T H R F F

25  
 4860  
 GCAATGCAATCTCTGTGCAACACTGTGTTTTCAGCCACAAATACCGGAGAAAACCTGAACCAATCAAAAGAAAGCTTAGGAA  
 A N G I L V H N T D G F Y A T I P G E K P E T I K K K A K E

30  
 4950  
 TTCTTAAATACATAAACTCCAACTTCCCGGTCTGCTGAGGCTTGAGTATGAGGGCTTTTACTTGAGAGGATTTTGTGTCAGAAAGAG  
 F L K Y I N S K L P G L L E L E Y E G F Y L R G F F V A K K

35  
 5040  
 CGCTATGCGGTATAGACGAGAAGGTAGGATAAGACAAAGGGCTCTGGAGTTGTAAAGGAGGCACTGGAGCGAATAGCCAAAGAGACC  
 R Y A V I D E E G R I T T R G L E V V R R D W S E I A K E T

40  
 5130  
 CAGGCTAAAGTCTTGAGGCAATACTTAAAGAGATAGTGTGGAAGAGCTGGGAAATGTTAAGGAGCTTGTGTAGGAGATAGCAAAA  
 Q A K V L E A I L K E D S V E K A V E I V K D V V E E I A K

45  
 5220  
 TACCAAGTCCCGCTTGAAAAGCTTGTATCCAGGACGAGATTACCAAGGATCTTANGTGAATACAAAGCCATTGGGCTCATGTAGCAATA  
 Y Q V P L E K L V I H E Q I T K D L S E Y K A I G P H V A I

50  
 5310  
 GCAAGAGGGCTTGCTGCAAGGGGAATAAAGTGAGACCCCGGACGATATTAAGCTATATGCTCCTCAGGGGAAGGGGAAGATTAAGTGAC  
 A K R L A A K G I K V R P G T I I S Y I V L R G S G K I S D

55  
 5400  
 AGGTAATTTTGTCTTTCAGGTATGATCCGAAAACACAAAGTACGACCCCGACTACTACATAGAAAACCAAGTTCTGCCGGGGGTGCTT  
 R V I L L S E Y D P K K H K Y D P D Y Y I E N Q V L P A V L

60  
 5490  
 AGGATCCTTGAAAGCTTGGGCTACAGAAAAGAGGACTTAAATAACCAAGCTCAAAACAGGTTCGACTGGAGCGGTGGCTTAAGAAGTAG  
 R I L E A F G Y R K E D L K Y Q S S K Q V G L D A W L K K \*

50 Seq. ID NO: 2 ORF der zusammengesetzten DNA-Sequenz der Plasmide pTY1-4 und die  
 daraus abgeleitete Aminosäuresequenz

SEQ. ID NO: 3

TY Exon

90  
 ATGATATTAGACACTGCTACATAACAAAGGACGGTAAACCCATAATTGCAATTTTCAAGAAGAGACAGGGGAATTATAAATGCAACTT  
 M I L D T D Y I T K D G K P I I R I F K K E N G E F K I E L

180  
 GATCCACATTTTCAGCOCTACATTACCOCTCTTCTCAAGATGACTCOOCTATTGATGAAATAAAAGCAATAAAAGGCGACAGCACCGA  
 D P H F Q P Y I Y A L L K D D S A I D E I K A I K G E R H G

270  
 AAAATTGTGAGAGTAGTGTGAGTGAAGTCAAGAAGAAATTTTGGGGAGAGATGTGAGGTCTGGAGCTTATATTGAGCATGCC  
 K I V R V V D A V K V K K K F L G R D V E V W K L I F E H P

360  
 CAAGACGTCCCGGCCCTAAGGGGCAAGTAAAGGACATCCAGCTGTGATTCACATTATGAGTACGACATAOCTTTGCAAGCGCTAC  
 Q D V P A L R G K I R E H P A V I D I Y E Y D I P F A K R Y

450  
 CTCATAGACAAGGGCTTGATCOCTATGGAGGGGAGAGAGGCTTAAGCTAATGGCTTGCATTGAGAGGTTTACACAGAGGGGAC  
 L I D K G L I P M E G D E E L K L M A F D I E T F Y H E G D

540  
 GAGTTTGGGAGGGGAGATANTATGATAAGCTAGCCGATGAGGAGAGGCAAGGGTAATTACATGGAAGATATTGATCTGCOCTAC  
 E F G K G E I I M I S Y A D E E E A R V I T W K N I D L P Y

630  
 GTTGATGTTGTATCCAAAGGAGATGATAAGCGGTTTGTGCAAAATGTCAAGGAAAGACCCGGATGCTCTGATAACTTACAT  
 V D V V S N E R E M I K R F V Q I V R E K D P D V L I T Y N

720  
 GGAGACACCTTTGTTTGGCTACCTTATAAAAGGGCAGAGAGTGTAGGAGTTACTCTCTCTTGGGGAGGGCAAGAACACCCCGAG  
 G D N F D L P Y L I K R A E K L G V T L L L G R D K E H P E

810  
 CCCAAGATTACAGATAGGGGCTAGCTTTGGCGTGGAATTAAGGCAGAAATCACTTTGATCTCTTCCCGGTGTGGGGAGAACATA  
 P K I H R M G D S F A V E I K G R I H F D L F P V V R R T I

900  
 AACCTCCACACATACACCTTACAGGAGTTTATGAAGCGCTCTTGGGAAAGAACAAAGCAAGCTGGGTGGGGAGGAATGGCGGCATC  
 N L P T Y T L E A V Y E A V L G K T K S K L G A E E I A A I

990  
 TGGGAAACAGAGGAGGATGAAGAAGCTGCGCCAGTCTGATGGAAGATGCTAGGGCAACTTATGAAGTGGAAAGAGTTTTCOCC  
 W E T E S M K K L A Q Y S M E D A R A T Y E L G K E F F P

1080  
 ATGGAGGCAGAGCTAGCAAGCTAATAGGCCAAGGATGGAAGTCTCAAGATCAAGCACTGGCAACCTTGTAGAGTGGTACCTGTTA  
 M E A E L A K L I G Q S V W D V S R S S T G N L V E W Y L L

1170  
 AGGGTGGCATATGAGAGGATGAGCTGGCTGGCAACAGCGGATGAAGAAGAGTACAGAGGGGTTAAGGACTACTTACCTGGGAGGA  
 R V A Y E R N E L A P N K P D E E E Y R R R L R T T Y L G G

1260  
 TAGCTAAAGAGCGCGAAGAGGCTTATGGGAGACATGCCCTATTAGACTTTAGGTCTCTATACCOCTCAATTATAGTTACCCACAC  
 Y V K E P E R G L W E N I A Y L D F R S L Y P S I I V T H N

1350  
 GTCCTCCCTGACACTTTAGAAAGAGAGGCTGCAAGATTAAGATGTGGCCCGATAGTAGGTTATAGTCTGCAAGGATTTCCCGGT  
 V S P D T L E R E G C K N Y D V A P I V G Y K F C K D F P G

1440  
 TTCATTCATCTATCTGGGGAATTAATCAATGAAGCAAGAAATAAGAGAGAGTGAAGCTACATTGACCAATAGAAAGAAA  
 F I P S I L G E L I T M R Q E I K K K M K A T I D P I E K K

1530  
 ATGCTTGATTATAGGCAAGAGCTGTAAATTGCTGGCAACAGCTATTACGGTTATATGGGCTATCCAGGCGAGGTGGTACTCGAAG  
 M L D Y R Q R A V K L L A N S Y, Y G Y M G Y P K A R W Y S K  
 5  
 1620  
 GAATGTGCCAAGAGGTACCGCGTGGGGAAGGCACTACATAGAATGACCATAAAGAGATAGAGGAGAATTTGGATTTAAGGTGCTA  
 E C A E S V T A W G R H Y I E M T I K E I E E K F G F K V L  
 10  
 1710  
 TATGCGACACTGATGGTTTAAAGGACAAATACCGGGAAGAAACCTGAAACAATCAAAAAGAAAGCTAAGGAATTCTTAAATACATA  
 Y A D T D G F Y A T I P G E K P E T I K K K A K E F L K Y I  
 15  
 1800  
 AACTCCAACTTCCCGGCTGCTGGAGCTAGAGTATGAGGGCTTTTACTTGAGAGGATTTTCTGGCAAGAGGCTATGGGGTATA  
 N S K L P G L L E L E Y E G F Y L R G F F V A K K R Y A V I  
 1890  
 GACGAAGAGGTAGCATACGCAAGGGGTCTGGAAGTGTAAAGGAGGAGCTGGAGCGAATAGCCAAAGAGACCCAGGCTAAAGTCTTG  
 D E E G R I T T R G L E V V R R D W S E I A K E T Q A K V L  
 1980  
 GAGGCAATCTTAAAGAAGATAGTGTGAAAAGCTGTGGAATGTTAAGGAAGTGTGAGGAGATAGCAAAATACCAAGTCCCGCTT  
 E A I L K E D S V E K A V E I V K D V V E E I A K Y Q V P L  
 2070  
 GAAAGCTTGTATCCAGAGCAGATTACCAAGGATCTAAGTGAATACAAAGCCATGGGCTCATGTAGCAATAGCAAGAGGCTTGCT  
 E K L V I H E Q I T K D L S E Y K A I G P H V A I A K R L A  
 2160  
 GCAAGGGGATTAAGTGAAGCCCGGCAAGTAAATAGCTATGCTGCTCAGGGGAAGCGGAAGATAGTGACAGGGTAATTTTGTCTT  
 A K G I K V R P G T I I S Y I V L R G S G K I S D R V I L L  
 2250  
 TCGAGTATGATCGAAAAACACAAGTACGACCCCGACTACTACATAGAAAACCAAGTCTGCGCGCGGTGCTTAGGATCTCTGAAGCC  
 S E Y D P K K H K Y D P D Y Y I E N Q V L P A V L R I L E A  
 2340  
 TTGGCTACAGAAAGAGGACTTAAATACCAAGCTCAAAACAGGTGGACTGACCGGTGCTTAAGAGTAG  
 F G Y R K E D L K Y Q S S K Q V G L D A W L K K \*

### Seq. D 10:3 Inteinfreie DNA- und Aminosäuresequenz der TY DNA Polymerase

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

#### Beispiel 1

#### Kultivierung von *Thermococcus spec. TY*

#### Herstellung des anaeroben Mediums

Die Medienherstellung wurde nach der HUNGATE-Methode (1969) durchgeführt. Durch Kochen wurde der Großteil des gelösten Sauerstoffs entfernt. Die hierdurch bedingte Steigerung des Redoxpotentials des Mediums wurde durch die Zugabe des reduzierenden Agens Cystein-HCl ( $E'_0 = -210$  mV) ausgeglichen. Hierdurch wurde ein von vielen Anaerobieren benötigtes, niedriges Reduktionspotential eingestellt. Als Redoxindikator wurde Resazurin verwendet. Das Medium veränderte bei der Reduktion des Resazurins zu Resofurin bzw. Hydroresofurin seine Farbe von blau zu pink bzw. farblos. Durch die Entfärbung des Mediums wurde somit ein ausreichend niedriges Redoxpotential angezeigt.

#### Kultivierung in Hungateröhrchen, Serum- und Steilbrustflaschen

Zusammensetzung des Mediums:

Stärke	5 g	
KCl	0,33 g	
MgCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,7 g	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,4 g	
NH <sub>4</sub> Cl	0,25 g	5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,14 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,14 g	
NaHCO <sub>3</sub>	1 g	
NaCl	18 g	10
Resazurinlösung 0,1%	1 ml	
Cystein-HCl	0,5 g	
Spurenelementlösung (s.n.)	10 ml	
Vitaminlösung (s.n.)	10 ml	
ad aqua dest	1000 ml	15

## Spurenelementlösung:

Nitriloessigsäure	1,5 g	20
MnSO <sub>4</sub>	0,5 g	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g	
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,18 g	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,18 g	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01 g	25
KAl(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0,02 g	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 g	
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025 g	30
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,3 mg	
ad aqua dest.	1000 ml	

## Vitaminlösung:

Biotin	2 mg	
Folsäure	2 mg	
Pyridoxin-HCl	10 mg	
Thiamin-HCl	5 mg	40
Riboflavin	5 mg	
Nikotinsäure	5 mg	
DL-Kalziumpantothenat	5 mg	
Vitamin B <sub>12</sub>	0,1 mg	45
p-Aminobenzoessäure	5 mg	
Liponsäure	5 mg	
ad aqua dest.	1000 ml	

Der pH-Wert wurde auf 6,9 eingestellt, das Medium gekocht und unter N<sub>2</sub>-Begasung abgekühlt. Anschließend wurde Cystein-HCl zugegeben und der pH-Wert nachreguliert. Die entsprechenden Gefäße wurden unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre befüllt und noch einige Minuten begast. Danach wurden sie mit Butylgummistopfen und Alukappen oder Draht verschlossen und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Kultivierung wurden die entsprechend vorbereiteten Mediengefäße 10%ig mit einer Flüssigkultur angeimpft und bei 88°C im Wasserbad 24 h inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend bei 4°C gelagert.

## Fermentation im Batch-Verfahren

Die Fermentation von *Thermococcus spec. TY* (DSM 10 597) erfolgte in einem 20 l-Edelstahlfermenter, der nach Angaben des Herstellers betrieben wurde. Das im Fermenter autoklavierte Medium wurde auf 88°C abgekühlt und der pH-Wert mit steriler KOH-Lösung auf pH 7 eingestellt. Während des Fermentationsvorgangs wurde mit N<sub>2</sub> begast (0,2 vv<sup>-1</sup>m<sup>-1</sup>). Nach vollständiger Reduktion des Mediums mit Cystein-HCl wurde mit einer frischen Vorkultur (max. 24 h) 10%ig angeimpft. Das Wachstum wurde photometrisch dokumentiert und die Fermentation in der späten log-Phase beendet.

Die Zellkulturen wurden auf 30°C abgekühlt und unter aeroben Bedingungen unsteril 30 min bei 4°C und 10 000 g abzentrifugiert. Größere Volumina (> 5 l) wurden kontinuierlich in einem Durchlaufrotor ebenfalls bei

4°C und 10 000 g sedimentiert. Das gewonnene Zellpellet wurde anschließend bei -20°C gelagert.

## Beispiel 2

### 16S rRNA Gen- Analyse aus Thermococcus TY

Die 16S rDNA wurde wie beschrieben amplifiziert (Bams S.M. et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91, 1609—1613, 1994; Rainey F.A. et al. System Appl. Microbiol. 16, 224—226, 1992; Rainey F.A. and Stackebrandt, FEMS Microbiology Letters 113, 125—128, 1993). Die Sequenzierung erfolgte mittels "Taq Dye-Deoxy™ Terminator Sequencing Kit" und "DNA Sequencer 373A" (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die 16S rDNA Sequenz (SEQ. ID NO: 1) wurde manuell gegen ausgewählte Spezies aus dem Reich der Archaea verglichen. Ein phylogenetisches Dendrogramm wurde nach der Methode von De Soete G., Psychometrika 48, 621—626, 1983 erstellt.

## Beispiel 3

### a) Isolierung chromosomaler DNA aus Thermococcus TY

Die Reinigung chromosomaler DNA erfolgte durch mehrmalige Phenolextraktion. Hierbei wurden ca. 200 mg Zellen von Thermococcus sp. TY (DSM 10 597) in 500 µl RNasepuffer resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch jeweils dreimalige Extraktion mit a) Tris gesättigtem Phenol und b) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:24:1) wurden die Zellen aufgeschlossen und Proteine denaturiert. Durch Zentrifugation wurde die wässrige von der Phenolphase getrennt, wobei sich die Proteine in der Interphase sammeln. Die DNA-haltige Lösung wurde dreimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) extrahiert, um Phenolrückstände aus dem Ansatz zu entfernen. Die gereinigte DNA wurde durch 1 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 4 M LiCl gefällt, bei 13 000 g abzentrifugiert, bei RT getrocknet und in sterilem H<sub>2</sub>O bidest. oder TE-Puffer gelöst. Die Qualität der DNA wurde elektrophoretisch überprüft und bei 260 nm photometrisch quantifiziert.

RNasepuffer 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

TE-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA

### b) Detektion von DNA-Polymerase kodierenden Sequenzen aus Thermococcus TY mittels PCR-Screening

Das Screening der Gesamt-DNA aus Thermococcus TY nach Sequenzen, die für eine DNA-Polymerase kodieren, erfolgte mittels PCR unter Verwendung verschiedener Konsensus-Oligonukleotid-Primer. Diese Primer wurden anhand von Sequenzvergleichen bereits bekannter DNA-Polymerasen aus der Ordnung der Thermococcales generiert. Die verwendeten Primer und deren Ableitung sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1

## Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Ableitung
tcg1	CCG CCA ATG ATA CTG GAC ACT GAT TAC ATA AC (SEQ. ID NO: 4)	Tli
c1190	TCA TAM GTT GCC YTW GCA TCT TCC AT (SEQ ID NO: 5)	Konsensus Tli, Pfu
c2981	ATT GGT GAG TTC ATA GAC CG (SEQ ID NO: 6)	TY
680pep-rev	GCD ACR TGN GGN CCD ATN GCY TTR TA (SEQ ID NO: 7)	Konsensus Pfu, Tgo
cty351	CGT GCA CAA CAC TGA TGG TT (SEQ ID NO: 8)	TY
cty770	ATT GGT GAG TTC ATA GAC CG (SEQ ID NO: 9)	TY
extein1	TAT GCG CAT ATG ATA TTA GAC ACT GAC TAC ATA (SEQ ID NO: 10)	TY (+NdeI)
extein2	GGG GTA TAG AGA CCT AAA GTC TAA ATA GGC GAT GTT (SEQ ID NO: 11)	TY (Fusion Extein I+II)
extein3	TTA GAC TTT AGG TCT CTA TAC CCC TCA ATT ATA GTT (SEQ ID NO: 12)	TY (Fusion Extein I+II)
extein4	ATA ACC GTA ATA GCT GTT TGC GAG CAA TTT AAC AGC (SEQ ID NO: 13)	TY (Fusion Extein II+III)
extein5	CTC GCA AAC AGC TAT TAC GGT TAT ATG GGC TAT CCC (SEQ ID NO: 14)	TY (Fusion Extein II+III)
extein6	AAA ACC ATC AGT GTC GGC ATA TAG CAC CTT AAA TCC (SEQ ID NO: 15)	TY (Fusion Extein III+IV)
extein7	CTA TAT GCC GAC ACT GAT GGT TTT TAC GCC ACA ATA (SEQ ID NO: 16)	TY (Fusion Extein III+IV)
extein9	TAT GCG AGA TCT CTA CTT CTT AAG CCA CGC GTC CAG (SEQ ID NO: 17)	TY (+BglII)

Die PCR wurde unter Verwendung des Expand High Fidelity PCR Systems (Boehringer Mannheim) und des angegebenen Programms mit einer Annealingtemperatur von 55°C und einer Elongationszeit von 2 Minuten durchgeführt.

Das Primerpaar [tcg1-c1190] ergab ein diskretes Fragment mit einer Größe von ca. 1,1 kb.

Dieses Fragment wurde mit Didoxenin (Dig)-gelabelten Nukleotiden markiert und als Sonde zur Identifizierung weiterer Fragmente eingesetzt.

#### c) Identifizierung homologer DNA-Fragmente mittels Southern Blot

Jeweils 2 µg chromosomale TY-DNA wurde mit einer der unten angegebenen Endonukleasen restringiert und in einem 0,7%ige Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA auf eine Nylonmembran

transferiert und fixiert. Als Hybridisierungssonde wurde das unter b) hergestellte Dig-markierte PCR-Fragment eingesetzt und der Southern Blot entwickelt (Abb. 3).

Auf dem Blot sind zwei Fragmente markiert (Pfeil), ein ca. 4 kb großes PstI-Fragment und ein ca. 5 kb SphI-Fragment, welche im folgenden auf das Vorhandensein von DNA-Polymerasesequenzen untersucht wurden. Aus einem zweiten Gel wurde die DNA der beiden Restriktionsansätze in diesen Größenbereichen aus dem Gel isoliert und zur Klonierung eingesetzt.

#### Beispiel 4

##### a) Konstruktion der Sequenzierungsvektoren pTY1 und pTY2

Mit den in Beispiel 3c) erhaltenen PstI- und SphI-Fragmenten wurde jeweils eine angereicherte Genbank erstellt. Hierdurch wurde die Anzahl der Klone drastisch reduziert. Die DNA wurde in den Plasmidvektor pUCBM21 (Boehringer Mannheim) ligiert. Für die jeweilige Plasmidbank wurde der Vektor mit PstI oder SphI restringiert und zur Reduzierung von Religationen dephosphoryliert. Der Ecoli-Stamm TG1 wurde mit dem Ligationansatz transformiert und jeweils 18 rekombinante Klone untersucht. Das Screening erfolgte mittels PCR. Jeweils ein Klon aus jedem Ansatz ergab mit dem Primerpaar [tcg1-cl190] ein 1,1 kb-Amplifikat. Die im folgenden als pTY1 und pTY2 bezeichneten Plasmide wurden zur weiteren Charakterisierung isoliert.

Die Direktion des Inserts im Vektor und die Größe des stromabwärts von der Primerregion tcg1 liegenden DNA-Bereichs wurde über PCR-Analyse ermittelt. Hierzu wurden die "pUC/M13 sequencing" und "reverse sequencing"-Primer verwendet (Boehringer Mannheim). Diese flankieren die jeweils linke und rechte Multikloningsite des Vektors. Entweder das Primerpaar [tcg1-pUC/M13 forward] oder [tcg1-pUC/M13 reverse] ergab, je nach Ausrichtung des Inserts, ein Amplifikat. Die Vektoren pTY1 und pTY2 sind in Abb. 4 graphisch dargestellt.

Die Inserts der beiden Plasmide wurden sequenziert. Die Sequenzierung ergab, daß das Insert von pTY1 in pTY2 enthalten war. Ein Sequenzvergleich der ersten 1230 Basen mit der DNA-Polymerasesequenzen aus *Thermococcus lithoralis* und *Pyrococcus furiosus* ergab eine Ähnlichkeit von 85% bzw. 76%. Die Länge des Inserts im Vektor pTY2, ausgehend vom Primer tcg1 mit einem hypothetischen Startkodon (Pos. 1) bis zur SphI-Restriktionsstelle des Vektors, betrug 3071 Basen.

##### b) Konstruktion des Sequenzierungsvektors pTY3

Ausgehend von der Sequenz des Plasmids pTY2 wurde versucht, DNA-Regionen jenseits der SphI-RE-Site mittels PCR zu amplifizieren. Hierzu wurde der Primer c2981 synthetisiert, der homolog zur Endregion des pTY2 Inserts ist. Zur Amplifikation wurde c2981 mit weiteren Konsensusprimern kombiniert, die aus Sequenzvergleichen von *Pyrococcus furiosus* abgeleitet wurden.

Mit einem entsprechenden Primerpaar [c2981-680pep-rev] wurde aus chromosomaler TY-DNA ein ca. 2,7 kb großes Fragment amplifiziert, das im folgenden charakterisiert wurde.

Das Amplifikat wurde gelelektrophoretisch von unspezifischen PCR-Produkten getrennt und aus dem Gel isoliert. Im folgenden wurde das Fragment direkt kloniert. Hierzu wurde der "TA Cloning® Kit" (Invitrogen) verwendet. Ecoli INVaF<sup>+</sup> wurde mit dem Ligationansatz transformiert und auf LB (Ampicillin, X-Gal) Agarschalen ausplattiert. Es wurden 6 rekombinante (weiße) Kolonien mittels PCR auf Insertion untersucht. Alle enthielten das geforderte 2,7 kb Fragment. Das im folgenden als pTY3 bezeichnete rekombinante Plasmid wurde isoliert und sequenziert (Abb. 5).

##### c) Konstruktion des Sequenzierungsvektors pTY4

Die Endregion des TY-Polymerasegens wurde durch eine abgewandelte Chromosome-Walking Methode identifiziert und kloniert. Zuerst wurde über PCR eine Dig-markierte Sonde mit dem Primerpaar [cty351-cty770] generiert. Diese repräsentierte eine 420 bp große Sequenz aus dem Endbereich der bis hierher bekannten Polymerasesequenz des Vektors pTY3. Auch diese Sonde wurde analog der oben beschriebenen Vorgehensweise zum Screening mehrerer Restriktionsansätze verwendet. Der Southern Blot ergab unter anderem ein Signal im 3 kb-Bereich des SphI-RE-Ansatz (Abb. 6).

Die DNA in diesem Bereich wurde wiederum isoliert und zur Ligation mit dem SphI restringierten und dephosphorylierten Vektor pUCBM21 eingesetzt. Dieser Ligationansatz wurde jedoch nicht wie die vorangegangenen Vektoren zur Transformation eingesetzt, sondern es wurde der an pTY4 angrenzende DNA-Bereich direkt über eine PCR amplifiziert. Hierzu wurde das Primerpaar [cty351-pUC/M13 rev] verwendet. Das ca. 1,2 kb lange Fragment enthielt die Endregion des TY-Polymerasegens und ein hypothetisches Stopcodon. Das Fragment wurde über Agarosegelelektrophorese isoliert und mittels "TA Cloning® Kit" (Invitrogen) kloniert. Es wurden 6 rekombinante (weiße) Kolonien mittels PCR auf Insertion untersucht. Alle enthielten das geforderte 1,2 kb Fragment. Das im folgenden als pTY4 bezeichnete rekombinante Plasmid wurde isoliert und sequenziert (Abb. 7).

#### Beispiel 5

##### a) Sequenzvergleiche mit archaeobakteriellen DNA-Polymerasen

Die Sequenzierung der vier Inserts der Plasmide pTY1-4 ergab ein offenes Leseraster (ORF) von 5487 bp Länge, welches 1829 Aminosäuren entspricht (SEQ. ID NO:2).

Multiple Sequenzvergleiche der Aminosäuresequenz des TY ORF mit den DNA-Polymerasen aus den Archaea *Pyrococcus furiosus*, P. Stamm GB-D, P. Stamm KOD1 und *Thermococcus lithoralis* zeigen hohe Homologien.

Der Sequenzabgleich ergab eine hohe Ähnlichkeit des TY ORF mit den aufgeführten Sequenzen und zwar nicht nur in den eigentlichen Polymerasebereichen, sondern auch in Regionen, die im maturierten Enzym nicht erscheinen. Bei diesen Regionen handelt es sich um "in frame"-Insertionen, sogenannte Inteine. Das primäre Translationsprodukt wird im Fall der Polymerasen KOD1, Deepvent und Tli posttranslational prozessiert. Man erhält durch die Verknüpfung der externen Bereiche ("Exteine") die maturierte DNA-Polymerase. Einige Inteine sind in ihrer Funktion als Endonukleasen beschrieben (Perler F.B. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5577–5581, 1992; Hodges R.A. et al, Nucleic Acid Res. 20–23, 1371–1377, 1992; Ming-Qun Xu et al, Cell 75, 1371–1377, 1993; Perler F.B. et al, Nucleic Acid Res. 22/7, 1125–1127, 1994; Petrokovski S, Protein Science 3, 2340–2350, 1994; T. Imanaka, Genbank entry D-29 671, 1994).

Abb. 8 gibt eine grafische Übersicht über die Lage der Ex- und Inteine in den im Alignment aufgeführten DNA-Polymerasen. Ausgenommen ist das Enzym aus *Pyrococcus furiosus*, welches keine Inteinelemente enthält.

Der TY ORF ist das einzige Gen, in dem alle drei konservierten Inteinregionen zu finden sind. Die hohe Homologie der einzelnen Exteinbereiche läßt eine exakte Identifizierung der hypothetischen Inteinbereiche im TY-DNA-Polymerasegen zu. Zur Expression der TY DNA-Polymerase wurden diese Regionen des Gens deletiert.

#### b) Deletion der Inteinregionen des TY-DNA-Polymerasegens mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Deletion der Inteinbereiche wurden die Exteinsequenzen des TY ORF mittels PCR amplifiziert und miteinander verknüpft. Abb. 9 zeigt schematisch die Vorgehensweise.

Die zu verknüpfenden DNA-Fragmente A und C wurden in getrennten PCRs mit den Primern  $a_{forw}$ — $a_{rev}$  und  $c_{forw}$ — $c_{rev}$  amplifiziert (1). Der Primer  $a_{rev}$  besitzt am 5'-Ende eine Sequenz, die zur N-terminalen Region des Fragments C homolog ist. Des weiteren ist der Primer  $c_{forw}$  zum C-Terminus des Fragments A homolog. Durch die PCR entstanden zwei Fragmente A und C, die jeweils um einen Bereich des anderen Fragments erweitert wurden (2). In einer zweiten PCR wurden diese Regionen miteinander hybridisiert und diese sich gegenseitig primenden DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang elongiert (3). Im selben PCR-Ansatz konnte das Fusionsfragment mit den Primern  $a_{forw}$  und  $c_{rev}$  amplifiziert und kloniert werden (3).

Im Fall des TY-DNA-Polymerasegens wurden zuerst die Exteinregionen 1 und 2 und die Regionen 3 und 4 fusioniert und in einer zweiten PCR die Fragmente Extein 1-2 und Extein 3-4 miteinander verknüpft. Die hierbei verwendeten Primer extein 1-7 und extein 9 sind in Tabelle 1 aufgeführt. Als Klonierungshilfe wurde über die PCR am N-terminalen Ende eine NdeI-RE-Site und am C-Terminus eine BglII-Site zur Klonierung in den Expressionsvektor angefügt (Primer extein 1 + 9). Die inteinfreie DNA- und Aminosäuresequenz der TY DNA-Polymerase findet sich in SEQ. ID NO: 3.

#### Beispiel 6

Klonierung in Ecoli und Reinigung einer rekombinanten DNA-Polymerase (TY Pol) aus *Thermococcus spec.* TY

#### a) Vektor

Als Expressionssystem wurde das pET Expression System 15b (Novagen, Madison USA, Cat. No. 69 668-1) verwendet. Der Vektor zeichnete sich durch folgende Eigenschaften aus:

- T7 Promotor und lacI Repressorgen
- His-Tag Leader Sequenz (Affinitätschromatographie an Ni-Chelatsäulen)
- N-terminale Thrombin Proteaseregion
- Fusionsklonierungsregionen NdeI, XhoI und BamHI
- Ampicillinresistenz (bla)

Das Polymerasegen wurde in die NdeI-BamHI RE-Site ligiert, so daß das resultierende Fusionsprotein eine N-terminale Histidin-Targetsites und eine Thrombin-Proteaseregion zur Entfernung der Histidinreste besitzt.

#### b) Verwendete Stämme und Anzucht

Zur Amplifikation des Vektors und zur Expression wurden verschiedene Stämme benutzt (Novagen).

- N vaBlue: endA1 hsdR17( $r_{K12}$ — $m_{K12}^{+}$ ) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [ $F'$  pro A + B + lacI<sup>qZ</sup> M15::Tn10( $tet^R$ )]
- BL21(DE3):  $F^{-}$  mpT hsdS<sub>B</sub>( $r_B$ — $m_B$ ) gal dcm (DE3)

Der Stamm NovaBlue diente zur Amplifikation des Vektors pTY Pol (Abb. 10). Die Expression des Zielgens wurde hier unterdrückt, da der Stamm kein T7 RNA-Polymerasegen enthält. Eventuell störende Einflüsse des rekombinanten Proteins auf das Wachstum der Zellen wurden somit reduziert.



Der Stamm BL21(DE3) trägt eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase. Diese steht unter der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren lacUV5-Promotors.

BL21(DE3) wurde mit dem Vektor pTY Pol transformiert und in LB-Medium unter selektiven Bedingungen kultiviert (LB + 50 µg/ml Ampicillin). Bei einer Zelldichte von OD 0,6 wurde die Expression mit 2 mM IPTG induziert und die Zellen bis in die spät log-Phase weiter kultiviert.

#### c) Zellaufschluß

Die abzentrifugierten Zellen wurden in TY-Aufschlußpuffer resuspendiert (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT) und im Ultraschall aufgeschlossen.

#### d) Proteinreinigung

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte in drei Schritten:

1. Hitzedenaturierung (80°C HD\*)
2. Chromatographie an Blue Sepharose (HiTrap Blue Pharmacia)
3. Chromatographie an Ni<sup>2+</sup> Chelat Harz (Novagen)

Der Rohextrakt wurde sofort nach dem Aufschluß 15 Minuten bei 80°C inkubiert. Die hitzelabilen denaturierten Proteine wurden bei 40 000 g 20 min abzentrifugiert und der Überstand filtriert (Ø 0,45 µm).

Blue Sepharose trägt als funktionelle Gruppe den Farbstoff Cibacron Blue 3G-A. Gebunden werden Proteine, die eine Nukleotidbindungstasche besitzen.

Der filtrierte Rohextrakt wurde mehrmals über eine 1 ml HiTrap Blue-Säule aufgetragen. Die maximale Bindungskapazität beträgt 20 mg Protein/ml Säulenmaterial. Ungebundenes Protein wurde mit TY-Aufschlußpuffer von der Säule gespült und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten eluiert (10 mM – 1,5 M KCl im Aufschlußpuffer). Die Flußrate betrug 0,5 ml/min bei 50 Fraktionen à 0,5 ml. Die enzymatisch aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Imidazolpuffer umgepuffert (Centricon, Ausschlußgröße 30 kDa).

Bei der Nickel-Chelatsäule binden die N-terminalen Histidinreste der rekombinanten Polymerase an immobilisierte Ni<sup>2+</sup>-Kationen des Säulenmaterials und werden bei der Elution durch Imidazol ausgetauscht.

Zu Beginn der Chromatographie wurde eine 1 ml Säule mit H<sub>2</sub>O dest. gespült und mit 50 mM NiSO<sub>4</sub> geladen. Danach wurde die Säule mit Imidazolpuffer equilibriert (5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,9). Die gepoolte, aktive Fraktion der Blue Sepharoseaufreinigung wurde auf die Säule aufgetragen und nicht gebundenes Protein eluiert. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten (5 mM – 1 M Imidazol im Säulenpuffer) eluiert (Flowrate 0,5 ml/min, Gradient 0–300 mM Imidazol, 15 ml = 30 Fraktionen, 300–1000 mM 2,5 ml = 5 Fraktionen). Die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde wie oben bestimmt.

Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen TY Polymerase Lagerpuffer dialysiert (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% Glycerin).

Tabelle 2

Reinigung von rekombinanter TY-DNA-Polymerase (Abb. 11)

Probe	Volumen [ml]	Protein [mg/vol]	Aktivität [U]	Spez. Akt. [U/mg]	Ausbeute [%]	Faktor
RE	10	6,6	2200	33,3	100	1
80°C HD*	8	0,51	1360	333	61,8	10
Blue	1	0,75	1030	1375	46,9	41,3
Ni-Chelat	0,5	0,44	980	4455	44,5	133,8

#### Beispiel 7

##### DNA-Polymerase-Aktivitätstest

Die DNA-Polymeraseaktivität wurde indirekt über einen "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) bestimmt. Als Substrat wurde mit DNaseI aktivierte Kalbsthymus DNA verwendet. Die DNA-Polymerase synthetisiert an das freie 3'-Ende zum Gegenstrang komplementäre freie Nukleotide. Zur Quantifizierung des neugebildeten Doppelstranges wurden neben den vier nativen Nukleotidtriphosphaten auch Digoxigenin gelabeltes dUTP (Boehringer Mannheim) im Reaktionsansatz angeboten. Nach der Polymerase-Reaktion wurde der dUTP-Einbau quantifiziert. Hierzu wurde ein DIG-Antikörper verwendet, der wiederum mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war (Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (AP)-Fab-Fragmente, Boehringer Mannheim). Zur Detektion wurde das AP-Chemoluminiszenz-Substrat Lumigen<sup>TM</sup> PPD (Lumigen Inc. Detroit, USA) eingesetzt. Die Lichtemission wurde im Luminometer gemessen und gegen eine Referenzpolymerase verglichen.

Der DNA-Polymerasetest setzte sich folgendermaßen zusammen:

**Inkubati nsmix:**

100 µl 10x Inkubationspuffer (jeweiliger Polymerase-Aktivitätspuffer, s. u.)  
3,3 µl dNTP's (10 mM Stammlösung, Endkonzentration 33 µM)  
3,6 µl Dig-dUTP (10 µM Stammlösung, Endkonzentration 36 nM)  
10 µl BSA (20 mg/ml)  
12 µg Kalbsthymus DNA (DNaseI aktiviert)  
ad 1000 µl aqua bidest.

Zu 50 µl Inkubationsmix wurden auf Eis 2 µl verdünnte Polymerase-Lösung zugegeben und 30 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion sofort mit 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Von diesem Ansatz wurden 5 µl auf membranbeschichtete Mikrotiterplatten (Pall SM045BWP) pipettiert. Der Boden dieser Mikrotiterplatten bestand aus einer Nylonmembran mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm. Die DNA im Reaktionsansatz wurde durch 10 Minuten Erhitzen auf 70°C an die Membran gekoppelt.

Die Detektion der Dig-markierten DNA erfolgte auf einer Vakuumkammer. Die einzelnen Lösungen wurden dabei durch die Membran gesaugt. Zuerst wurde 2 mal 2 Minuten mit 100 µl Blockingpuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Danach wurde 2 mal 2 Minuten mit 100 µl Antikörperlösung inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Lösungen unter Vakuum abgesaugt. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden unter Vakuum 2 mal 200 µl Waschpuffer aufgetragen und 2 mal mit AP-Puffer umgepuffert. Die Detektion erfolgte durch 5 Minuten Inkubation mit Lumigen™ PPD (1 : 100 in AP-Puffer). Das Substrat wurde abgesaugt und die Lichtemission nach weiteren 15 Minuten im Luminometer gemessen.

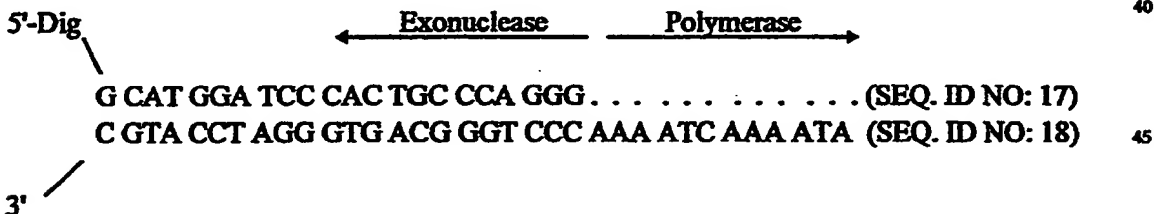
Als Referenzenzym zur Eichung wurde Taq DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) verwendet.

Taq Pol-Inkubationspuffer (10x) 250 mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTT	
TY Pol-Inkubationspuffer (10x) 500 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1000 mM KCl, 40 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT	25
Maleinsäurepuffer 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl pH 7,5	
Blockingpuffer 1% (w/v) Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer	
Waschpuffer 0,3% Tween® in Maleinsäurepuffer	
Antikörperlösung 150 mU/ml Anti-DIG-Alkalische Phosphatase (Fab-Fragmente, Boehringer Mannheim) in Blockingpuffer	30
AP-Puffer 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub>	

### Beispiel 8

### 3'-5'-Exonuklease-Aktivitätstest

Die 3'-5'-Exonuklease-("proofreading") Aktivität wurde mit Hilfe von 5'-Digoxigeninmarkierter DNA bestimmt. Als Testsubstrat diente ein definiertes DNA-Primer/Template-Hybrid.



In diesem Test wurde die Fähigkeit der DNA-Polymerase zur Degradation des Dig-Primers gemessen. Des 50  
weiteren konnte bestimmt werden, ab welcher Konzentration freier Desoxynukleotidtriphosphate im Reak-  
tionsansatz die Polymeraseaktivität gegenüber der Exonukleaseaktivität überwiegt. Des weiteren wurde die  
Fähigkeit zum Einbau von Ribonukleotiden getestet.

**Pipettierschema eines Reaktionsansatzes:**

1 µl 5'-Dig-Primer (500 fmol)	55
1 µl Template (500 fmol)	
1 µl dNTPs (Endkonzentration 1 pM—10 µM)	
1 µl Polymerase Aktivitätspuffer (10x)	
1 µl DNA-Polymerase (100 mU)	
ad 10 µl aqua bidest.	60

Der Reaktionsansatz wurde bei 60 Minuten bei 70°C inkubiert, auf Eis mit 2 µl Formamidpuffer versetzt und die DNA-Fragmente in einem 12,5%igen Polyamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Der Transfer und die Detektion der Dig-markierten Fragmente erfolgte nach Angaben Boehringer Mannheim ("Dig System Users Guide for Filter Hybridization", 1993).

### Beispiel 9

### Anwendung der TY-DNA-Polymerase in der PCR

Das Enzym wurde unter folgenden Bedingungen in der PCR eingesetzt:

### Mix 1

			Endkonzentration
dGTP (10 mM)	1	μl	200 μM
dATP (10 mM)	1	μl	200 μM
dTTP (10 mM)	1	μl	200 μM
dCTP (10 mM)	1	μl	200 μM
Primer 1 x	μl	600 nM	
Primer 2 x	μl	600 nM	
Template DNA	x	μl	100 ng
H <sub>2</sub> O ad	25	μl	

### Mix 2

10x PCR- Puffer	5	μl
TY DNA-Polymerase	1	μl (2 U)
H <sub>2</sub> O ad	25	μl

Die Ansätze werden getrennt voneinander auf Eis pipettiert und direkt vor Start der Reaktion vereinigt. Im folgenden sind Eckdaten eines Cycleprogramms angegeben:

1x	2 min	94°C	(Denaturierung der Template-DNA)
10 sek	94°C		(Denaturierung)
10x 30 sek	55°C		(Annealing des Primers)
2-4 min	68°C		(Elongation)
10 sek	94°C		(Denaturierung)
20x 30 sek	55°C		(Annealing des Primers)
2-4 min*	68°C		(Elongation + *Verlängerung 20 sek/Cycle)
1x	7 min	68°C	(Elongation)

10x PCR Puffer 100 mM Tris-HCl, pH 8,9, 1 M KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 μg/ml BSA, 0,5% (v/v) Tween 20

Es konnten Fragmente von 1,3 kb (Spur 1), 2,6 kb (Spur 2) und 4,35 kb (Spur 3) amplifiziert werden (Abb. 1a).

### Patentansprüche

1. Thermostabiles Enzym erhältlich aus einem *Thermococcus spec.*-Stamm, welches die Polymerisation von Desoxyribonukleinsäuren katalysiert, 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist und eine durch die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ. ID NO: 2 oder SEQ. ID NO: 3 codierte Aminosäuresequenz oder ein Teil davon aufweist.
2. Thermostabiles Enzym gemäß Anspruch 1 erhältlich aus *Thermococcus spec. TY* (DSM 10 597).
3. Enzym nach Anspruch 1 oder 2, welches eine optimale DNA-Polymerase-Aktivität in Gegenwart von Magnesiumionen und in vollständiger oder nahezu vollständiger Abwesenheit von Manganionen aufweist.
4. Enzym nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Magnesiumionen-Konzentration zwischen 2 und 10 mM und die Konzentration an Manganionen zwischen 0 und 2 mM beträgt.
5. Enzym nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine optimale 3'-5'-Exonukleaseaktivität in Gegenwart von maximal 1 μM der Desoxynukleotidtriphosphate und in Abwesenheit von Ribonukleotidtriphosphaten aufweist.

6. DNA-Sequenz, die für ein aus *Thermococcus spec. TY* (DSM 10 597) erhältliches Protein mit DNA-Polymerase-Aktivität oder einen Teilbereich von diesem codiert.
7. DNA-Sequenz nach Anspruch 6, w bei die DNA-Sequenz mindestens ca. 1200 Basenpaare aufweist.
8. DNA-Sequenz nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ. ID NO: 2 oder SEQ. ID NO: 3 aufweist.
9. Vektor, welcher eine DNA-Sequenz gemäß der Ansprüch 6 bis 8 aufweist.
10. DNA-Sequenz, die für ein thermostabiles Enzym gemäß Anspruch 1 codiert.
11. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 10, die in den NdeI/BamHI-Restriktionsbereich des Expressionsvektors pET-15b ligiert ist.
12. Verfahren zur Gewinnung eines thermostabilen Enzyms mit DNA-Polymerase- und 3'-5'-Exonuklease-Aktivität durch Expression in einem geeigneten eukaryotischen oder prokaryotischen Stamm unter Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß der Ansprüche 9 oder 11 und anschließende Isolierung des Enzyms, dadurch gekennzeichnet, daß nach Zellaufschluß, der Extrakt einer Hitzebehandlung unterzogen wird und anschließend eine Affinitätschromatographie sowie eine Chromatographie am Nickelchelat-Harz durchgeführt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Hitzebehandlung bei ca. 80° C über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten erfolgt und/oder die Affinitätschromatographie an Blue Sepharose vorgenommen wird.
14. Verfahren zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten unter Verwendung eines thermostabilen Enzyms gemäß einer der Ansprüche 1 bis 5 und mindestens eines geeigneten Primerpaares und der erforderlichen Nukleotidtriphosphate, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion in Gegenwart einer bei ca. pH 8,9 puffernden Substanz bzw. entsprechenden Mischung, von 10 bis 100 mM Kaliumchlorid, 0,75 bis 4 mM Magnesiumchlorid und 0,01 bis 0,1% eines zwitterionischen Detergenzes durchgeführt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß Desoxynukleotidtriphosphate in einer (Gesamt-)Konzentration von maximal 1 µM im Reaktionsansatz enthalten sind.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration an Magnesiumionen ca. 1,25 mM beträgt.

---

Hierzu 13 Seite(n) Zeichnungen

---

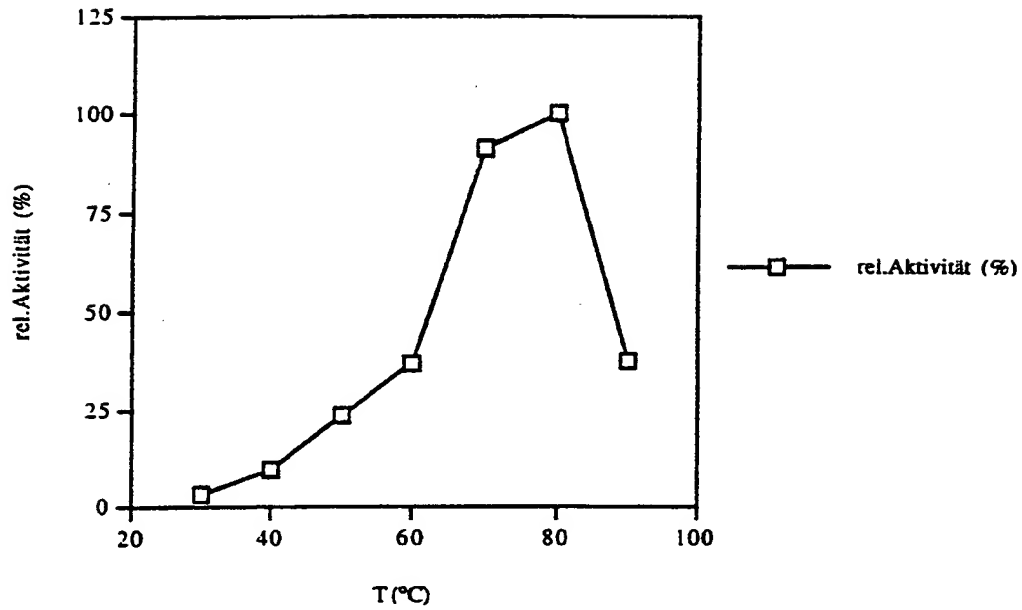


Abb. : 1a

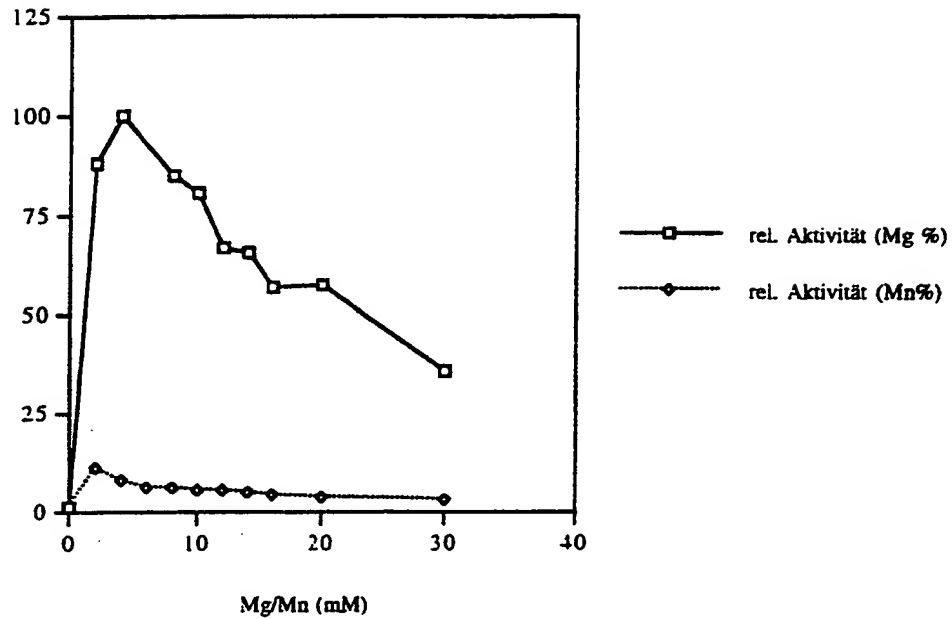


Abb.: 16

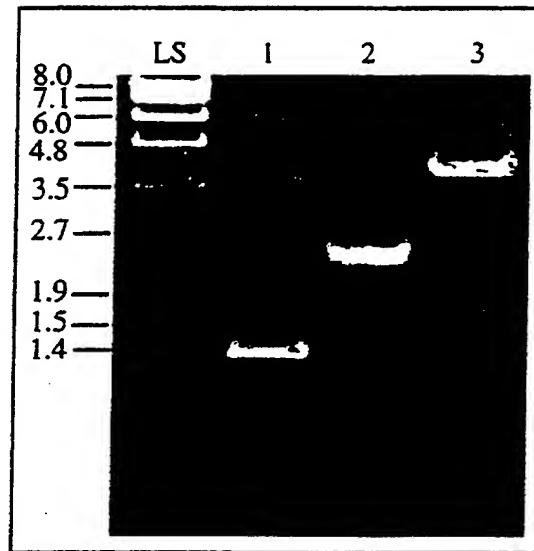


Abb. : 2

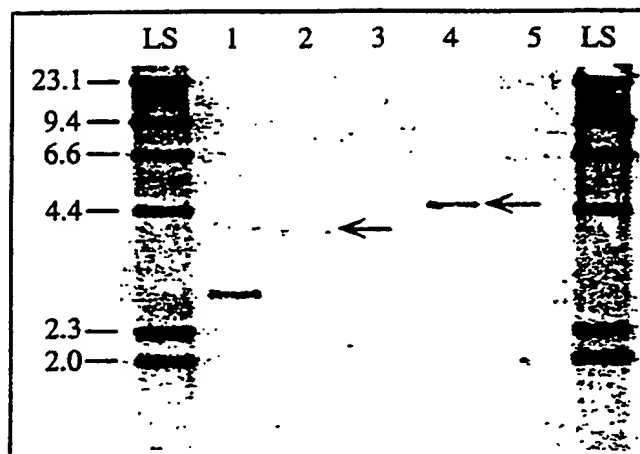


Abb.: 3



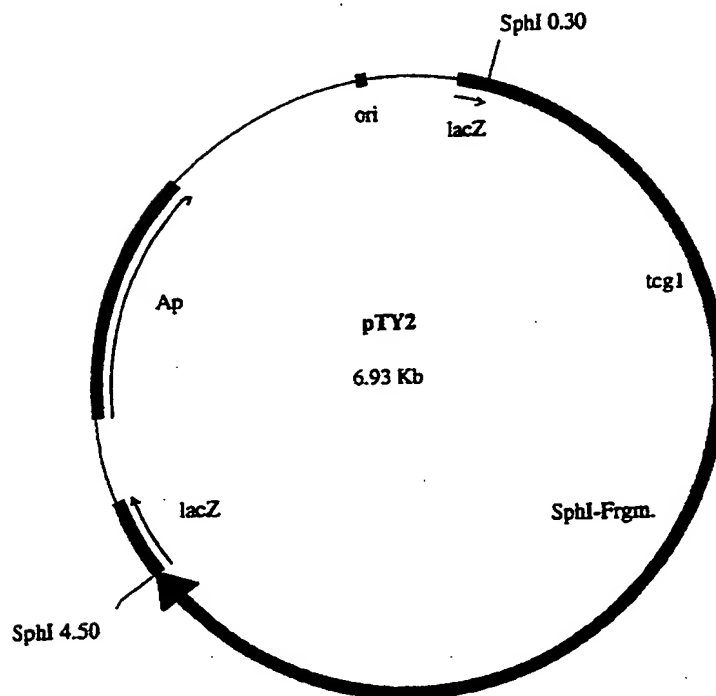
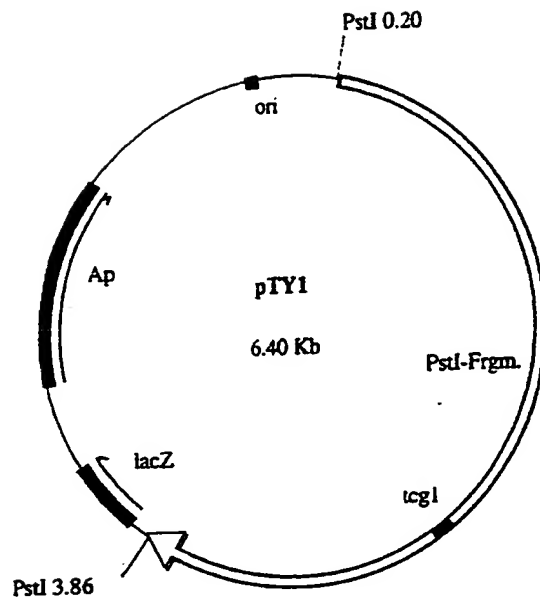


Abb. : 4

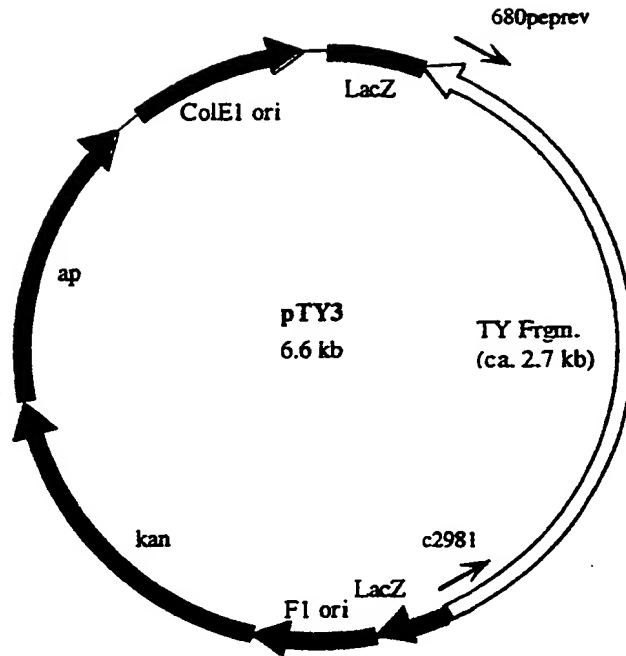


Abb.: 5

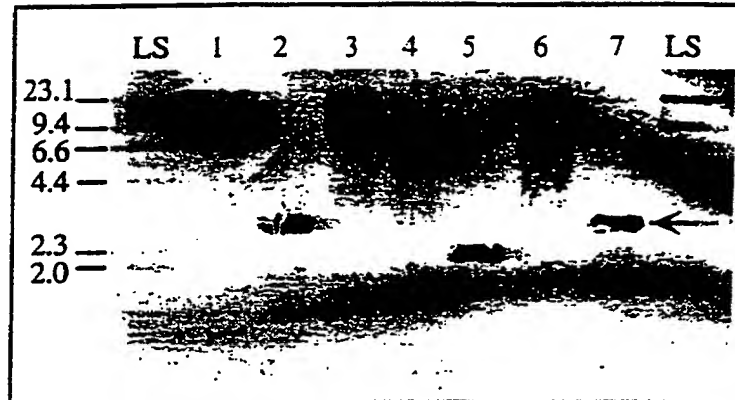


Abb.: 6

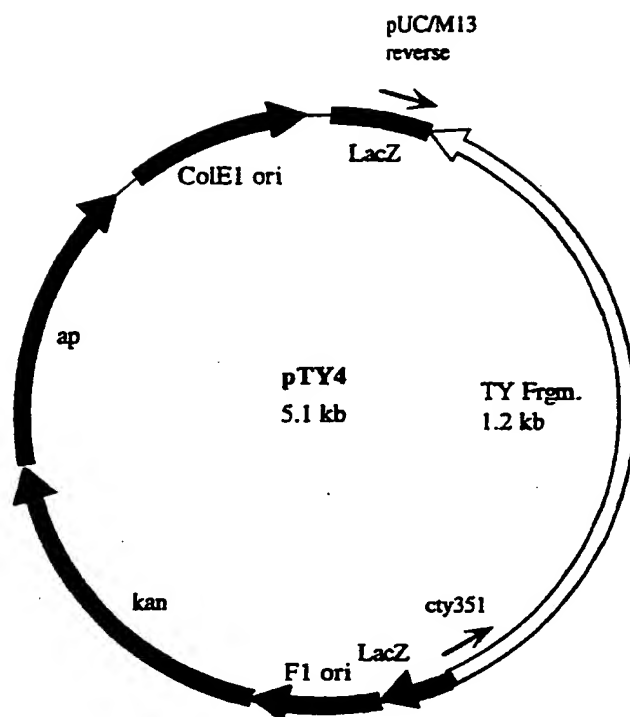


Abb.: 7

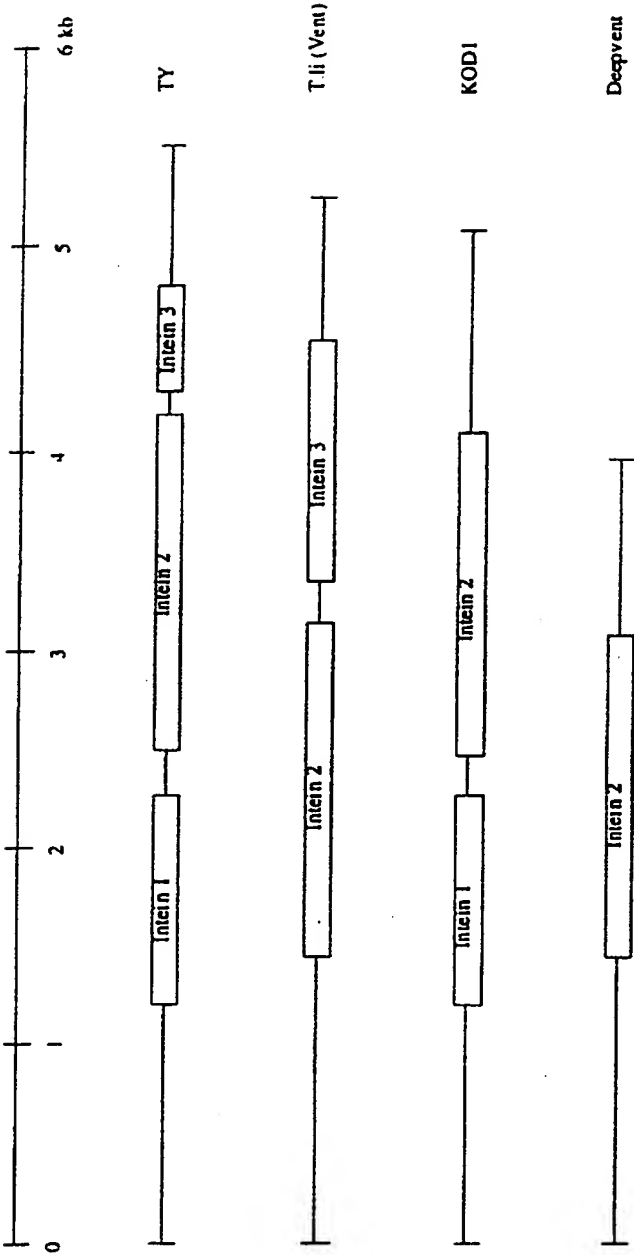


Abb.: 8

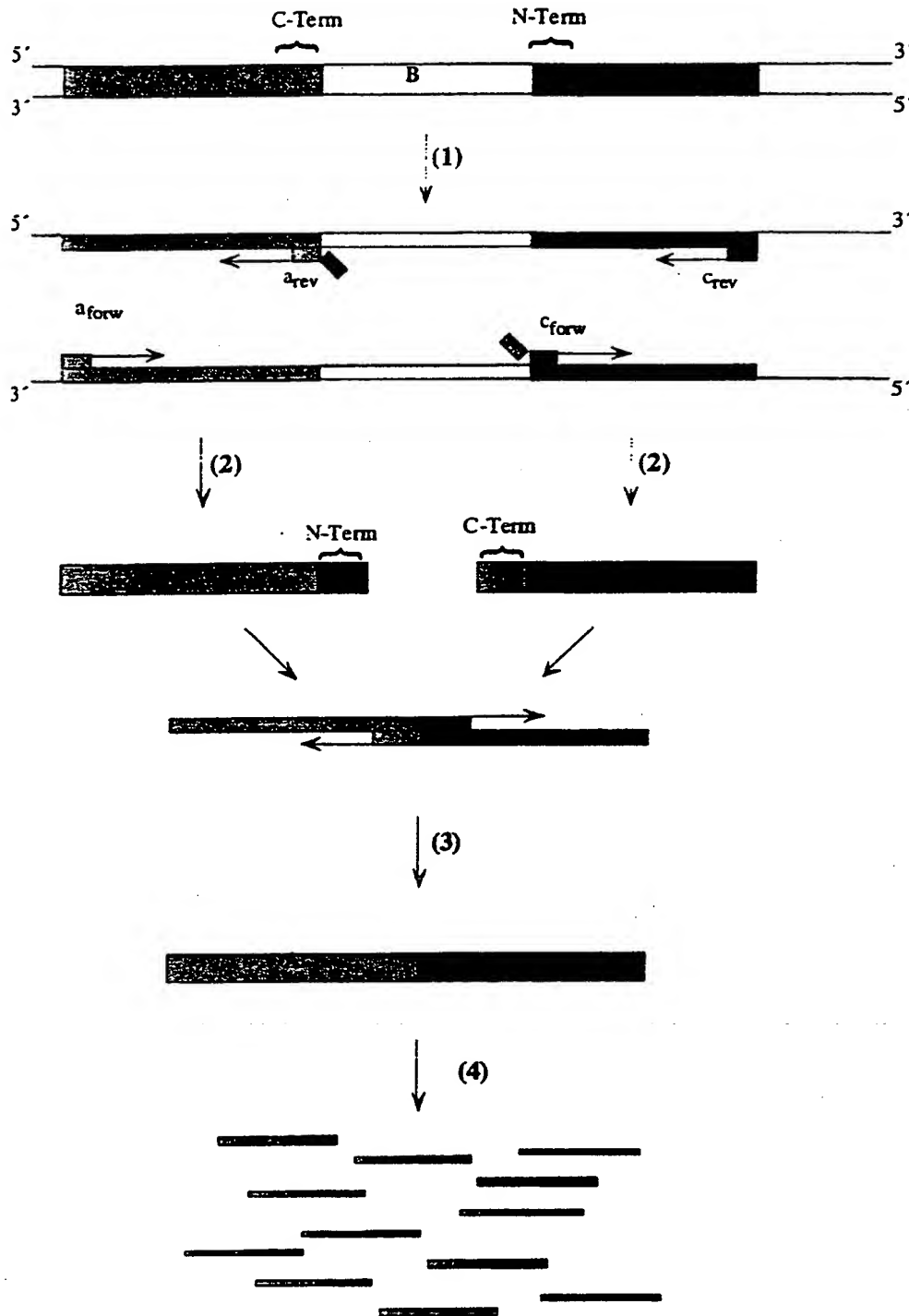


Abb.: 9

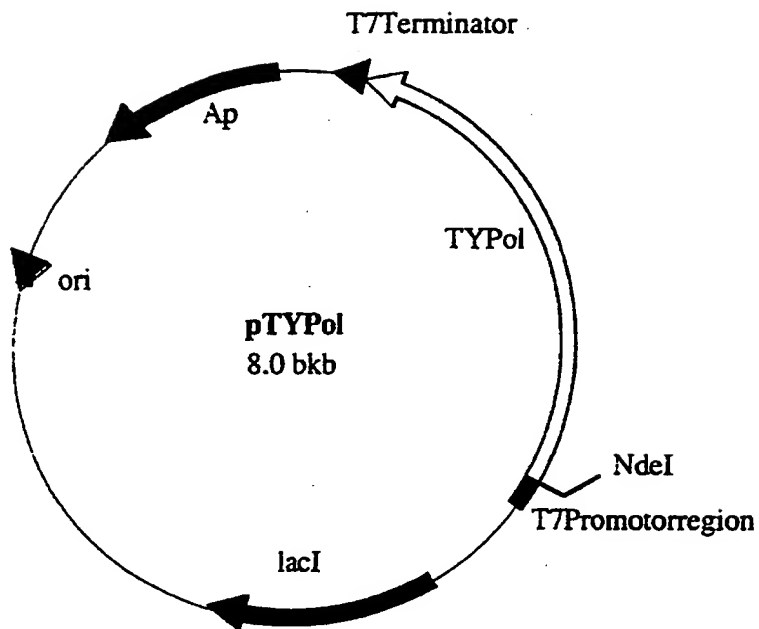


Abb.: 10

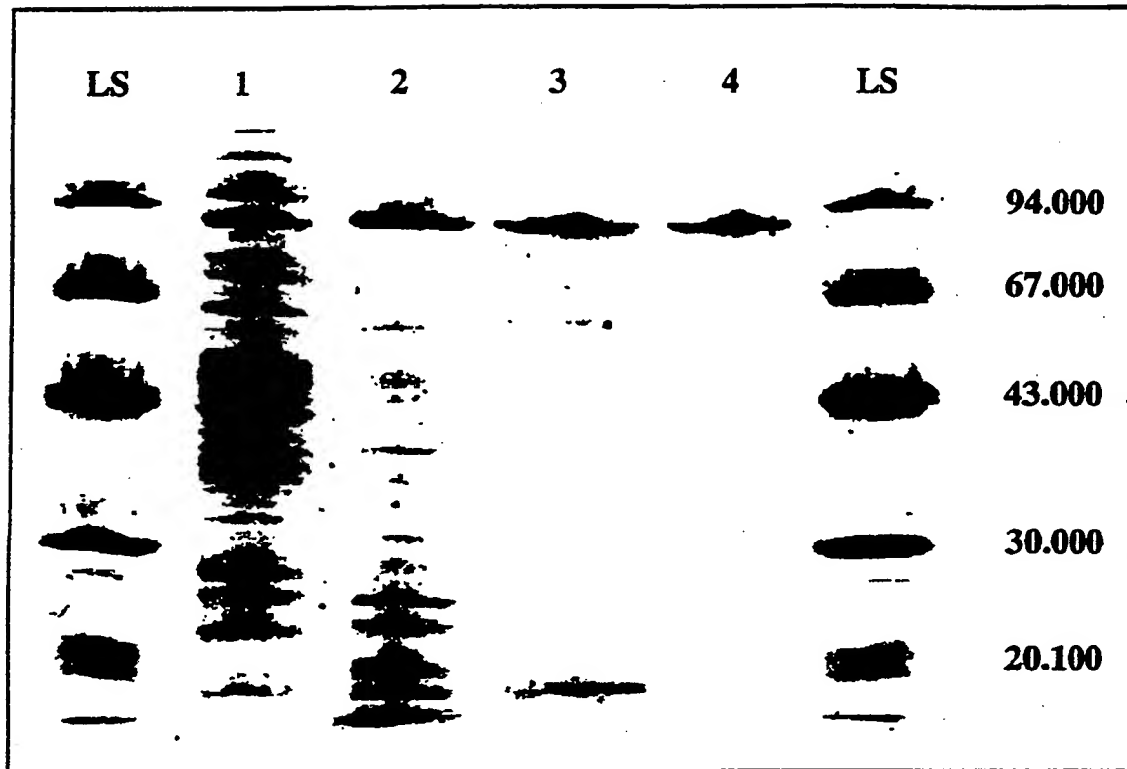


Abb. : 11



a)

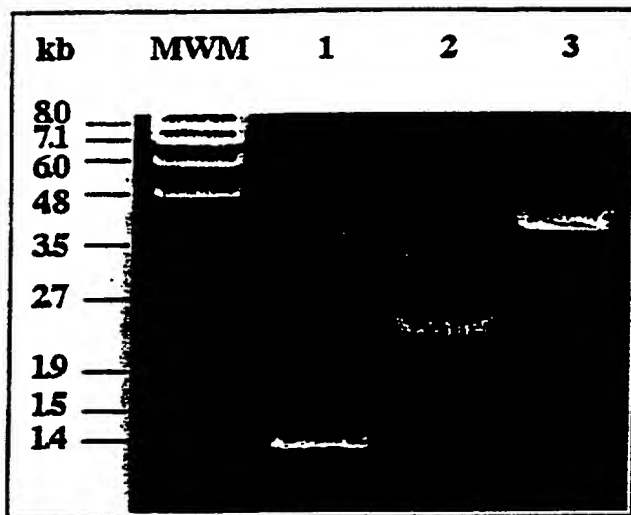
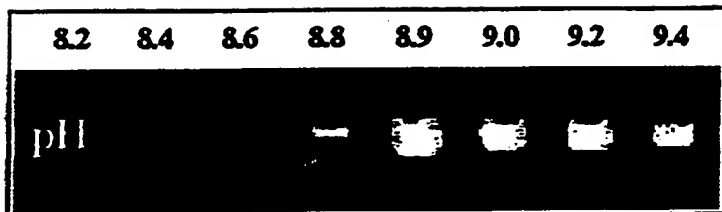


Abb.: 12

b)



c)

